中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）47(4)：377～387（1998）

甜瓜逢機增幅多型性核酸(RAPD)標誌分析及其遺傳特性之研究[1]

劉邦基 張有明 許華欣 鄭櫻慧 張慧如 蕭吉雄[2]

摘要：本研究以一組包含三個世代之甜瓜族群爲材料，進行甜瓜的逢機增幅多型性核酸(random amplified polymorphic DNA, RAPD)分析，並探討其特性。試驗中證明甜瓜模板核酸在 PCR 反應前先以限制酶處理會改變 RAPD 條帶數目，使分析圖譜發生變化，增加多型性之顯示機率，因此可提高分析效率。此種酵素所引起的條帶增減現象極爲穩定，其中具有多型性者在後代中之分離情形並符合孟德爾遺傳原理。本報告進一步對酵素處理所引起的圖譜變化提出解釋。配合限制酶的使用，更可證明RAPD基因座之獨立性，增加對RAPD的瞭解。本報告並對RAPD標誌所顯示的甜瓜遺傳特色加以探討，以爲遺傳連鎖分析與建立連鎖圖之基礎。

關鍵詞：甜瓜、聚合酶連鎖反應、逢機增幅多型性核酸標誌、遺傳分析。

前　言

甜瓜*(Cucumis melo L.)*爲重要之蔬果類作物，其種類繁多[2]，本省所栽培者包括東方甜瓜、洋香瓜、哈蜜瓜和越瓜。甜瓜育種爲農業試驗所之重要研究項目[3]，本所所收集之種源亦極豐富，便於各種研究。雖然已知甜瓜之變異性極爲豐富，但以分子生物學爲基礎之遺傳學研究，至今尚僅限於基本方法及少數遺傳特性之探討[4, 20, 35]，顯然極爲不足，有必要加強進行。本研究擬建立甜瓜分子標誌資料，藉以探討其遺傳特性，期能有助於提高遺傳與育種研究之效率。逢機增幅多型性核酸(random amplified polymorphic DNA)是應用 PCR (polymerase chain reaction)方法所測得的生物遺傳變異，屬於分子標誌的一種，簡稱 RAPD[31]，是研究生物遺傳的有利工具，由於分析方法簡便，廣受學者使用，目前已應用在多種植物與微生物的遺傳研究上[11, 13, 26, 28, 29, 30, 32]。本研究在進行RAPD分析時，將限制酶應用於分析上，以探討其對分析效果之影響，並以一組包含三個世代的甜瓜族群建立所需的RAPD標誌資料，藉以探討甜瓜的遺傳特性，作爲進一步研究之基礎。

材料與方法

一、植物材料

用於分析之甜瓜材料包括：SLK-V-052 品種之 S_4 自交系(屬東方型甜瓜，供作母本)和天香品種之 S_6 自交系(屬洋香瓜型，供作父本)各一株、該兩植株之雜交後代(F_1)五株、其中一 F_1 植株所產生的 80

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1960 號。
2. 本所園藝系副研究員、助理研究員、助理、助理研究員、約雇助理、研究員兼系主任。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

棵 F_2 後代(從三百餘株中逢機選出，後來有 3 株死亡，剩 77 株)。父母本與 F_1 植株係種植於田間，F_2 族群則種植於溫室中。試驗時以嫩葉作爲萃取核酸之材料。

二、 植物核酸的萃取方法及其供作 PCR 反應模板前之處理

根據 Dellaporta 等人[8]所發表的 DNA 萃取方法，經本實驗室加以局部修改後，用以萃取所需的甜瓜 DNA。主要修改之處是在萃取過程後期加入酚洗步驟以提高 DNA 純度。以 TKO 100 Fluorometer (Hoefer Scientific Instruments) 測定 DNA 濃度。

所萃取之 DNA 或直接作爲 PCR 的反應模板，或先以一種限制酶切割後再經一次酚洗與酒精沉澱以去除限制酶之干擾再供作反應模板。用以切割甜瓜 DNA 之限制酶包括 *Hae*Ⅲ, *Cfo* Ⅰ, *Taq* Ⅰ, *Nde*Ⅱ, *Rsa* Ⅰ, *Alu* Ⅰ 和 *Msp* Ⅰ 等七種(Boehringer Mannheim Biochemica)。

三、 PCR 反應程式及方法

分析時根據 Skroch 和 Niehuis[25]、Witter[33]等所發表之方法，並採用 Idaho Technology 公司之#1605 型 Air Thermo-Cycler 進行 PCR 反應。使用 Operon 10-mer kits (Operon Technologies, Inc.)之 10-mer 核酸引子，以及 HT Biotechnology 之 Super Taq 聚合酵素。最終之反應物 1.4%之瓊脂膠體進行電泳分離，經 ethidium bromide 染色後以 Polaroid 相機拍照，供作判讀與分析之依據。

四、 多型性 RAPD 標誌之篩選與確認

多型性 RAPD 標誌之篩選係根據父母本及 F_1 植株所呈現之電泳條帶加以研判。用於分析之甜瓜 DNA，包括採用上述酵素先予切割以及未酶解者，共有八種處理方式。每一種引子皆首先用於測試該八種處理方式之條帶圖譜，以觀察其異同，增加多型性之發現機率。凡電泳結果顯示父母本之一方有條帶，另一方在相同位置無條帶者，即認定該條帶之變化係代表一個具有多型性 RAPD 基因座(RAPD-locus)之存在。多型性基因座中，若產生 F_2 族群之 F_1 植株亦具有相對應之條帶，則進行 F_2 族群分析，再以卡方分析檢測其分離情形。

結　果

一、 PCR 反應方法及限制酶對甜瓜 RAPD 分析效果之影響

本試驗比較多種不同 PCR 反應條件，以探討最適合甜瓜的 RAPD 分析方法，發現反應液中的鎂離子濃度若提高爲 3 mM，並以 42℃爲煉合(annealing)溫度，效果最理想，其他因素之變化對分析結果之影響則較不顯著，此與 Skroch 和 Niehuis[25]根據相似機型所獲之結論相似。在甜瓜分析中，每一逢機引子可產生 1～15 個條帶，以 3～6 條帶者最普遍。經多次重複分析證明各條帶之再現性達 80～100 %，足見所建立之方法具有極佳之可靠性。

本試驗除了使用未經限制酶切割之模板進行PCR反應，尙以切割後之核酸爲模板進行分析。從兩者之比較中，發現酵素處理會改變電泳圖譜形態，並可提供更多的遺傳變異資料(圖 1、表 1)。詳言之，與未經酵素切割之處理相比較，酵素不僅會導致某些條帶消失，且會產生新條帶。曾有報告謂 PCR 易因高靈敏性造成條帶不穩定現象[18,34]，然而本試驗中酵素所產生的影響顯然與此不同，因多次重覆分析已證明這種變化爲極穩定者，非屬實驗誤差。表 1 爲根據 50 條引子的分析結果之統計，顯示分析圖譜之變化方式因酵素種類而異。詳言之，在單一酵素的影響下，維持原先圖譜類型之機率僅爲 23.7%，產生新條帶之機率爲 16.3%，而造成部份條帶消失之機率則達 67.1%，因此條帶增減之機率共爲 83.4%，可見酵素對電泳圖譜的影響實不容忽視。比較同組處理之結果，可進一步發現酵素引起之條帶變化亦可因植株而異，當其在父母本間並非同步變化時，便會顯示新的多型性基因座。圖 1 爲親本和 F_1 世代經不同處理所得之電泳圖譜，其中以 *Nde*II 切割時可顯示一組多型性標誌，該標誌在未使用酵素時則無法顯示其多型性，可見酵素在 RAPD 分析上之價值；進一步分析更發現該多型性標誌在 F_2 族群中亦有分離現象(圖 2)，且經卡方分析顯示與孟德爾遺傳原理所估測之分離比(3：1)相符。

表 1. 限制酶處理對 RAPD 條帶圖譜的改變機率[z]

Table 1. The possibility of RAPD banding pattern change caused by one restriction enzyme [z]

No difference		23.7 %
Caused band (s) disappearance	67.1 %	
Produced new band(s)	16.3 %	
	83.4 %(subtotal)	

[z] Based on the result of analysis using 50 primers.

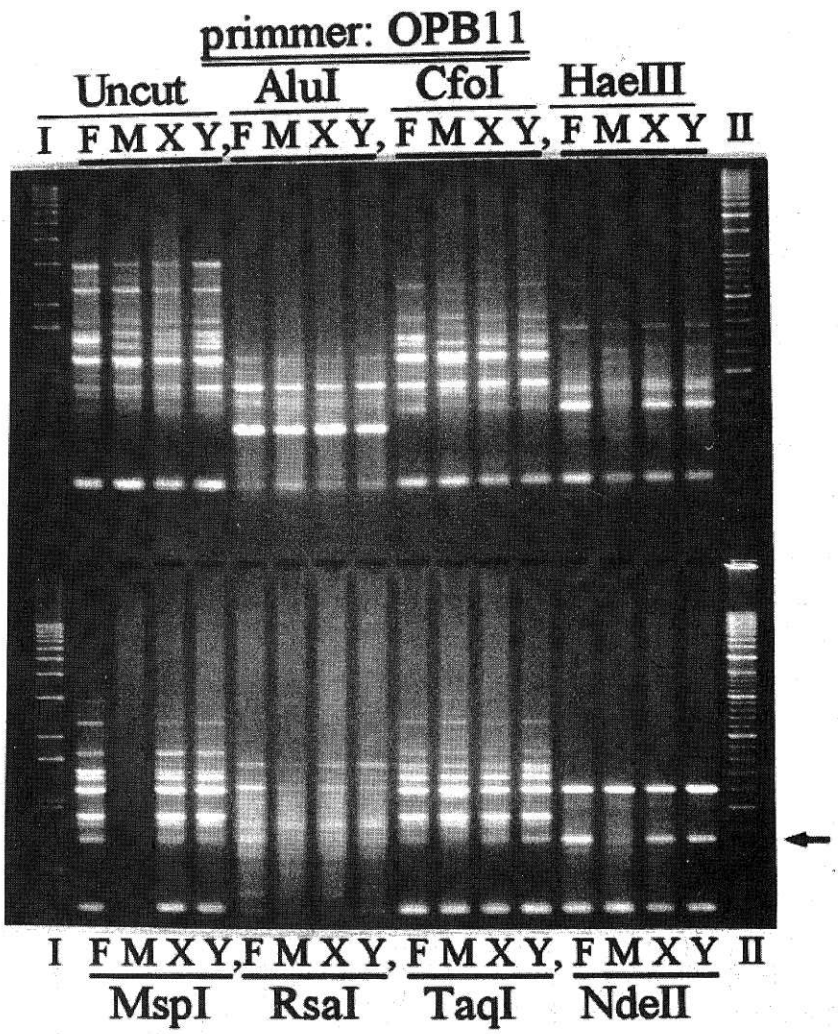

圖 1. 甜瓜模版核酸以不同限制酶切割後再以 OPB11 引子進行分析所呈現的 RAPD 譜圖式樣之變化情形

Fig. 1. Variation of RAPD banding patterns in *Cucumis melo* caused by different restriction enzymes which were used to digest template DNA before PCR. Uncut： template DNAs were not digested by restriction enzyme, F： female parent, M： male parent, X and Y：F1 hybrids, I and II： 1kb and 200 bp DNA ladders, respectively. All the template DNA were primed with the 10-mer primer OPB11

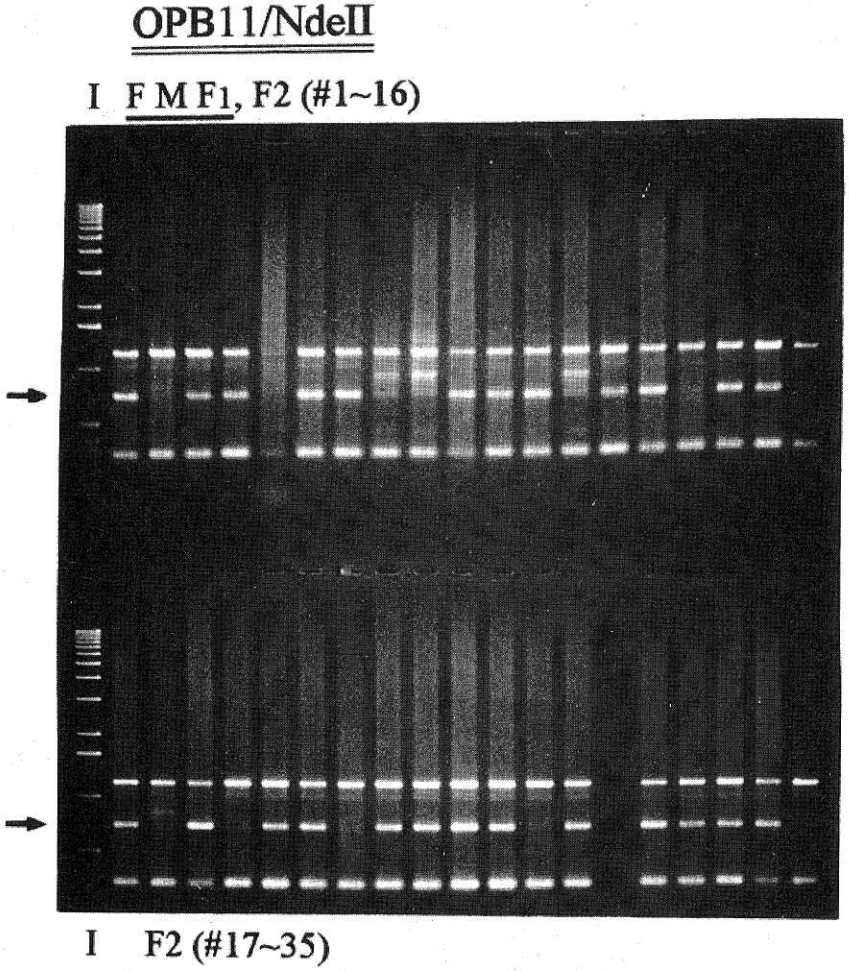

圖 2. 甜瓜多型性條帶(箭頭指處)在 F_2 族群中之分離情形

Fig. 2. Segregation of a polymorphic band (arrow pointed) in the F2 population of *Cucumis melo*. The template DNAs were digested with the restriction enzyme *Nde*II before PCR, and all the DNAs were primed with the 10-mer primer OPB11. F：female parent, M：male parent, F_1：hybrid, F2 # 1～35：F_2 plants derived from the F_1 plant.

二、甜瓜之 RAPD 及其多型性現象

圖 3 爲 100 個逢機引子產生的所有條帶之長度分佈情形，由圖可知，無論是否使用酵素，所增幅之條帶大部份介於 0.5～2.0kb 之間，且其分佈趨勢十分相似；雖如此，酵素處理者所產生的長條帶則較少，尤以＞ 1.5 kb 者最明顯，顯示酶解會明顯降低長條帶的出現機率，進一步觀察各電泳照片亦發現酵素對圖譜式樣之影響係以長條帶區域爲主。

以親本間之差異作爲多型性依據，詳細調查上述 100 條引子之分析結果，顯示甜瓜 RAPD 標誌的偵測效率與酵素有極大關係。由表 2 可知，未使用酵素時，可偵測到多型性之引子未及 1/4(24 條)，所建立之多型性標誌僅 68 個；若將本試驗中七種酵素的使用效果一併列入計算，則可測得多型性現象之

引子數增爲 84 個，僅剩 16 個引子無法提供變異資料，所建立之多型性標誌總數增至 310 個(不同酵素處理間的相同基因座不重複計算)，較原先增加 242 個，平均每一酵素可無重複地增測 34.6 個(242/7)。因此，酵素之應用使得本試驗中多型性標誌的偵測效率提高爲 4.6 倍 (310/68)，平均一種酵素可使引子之分析效率增加 51.4%。

表 2. 限制酶的使用對引子偵測效果及多型性標誌數目之影響[z]

Table 2. The influence of restriction enzyme digestion of template DNA on the polymorphism detection [z].

Treament	Without polymorphism		Without polymorphism	
	No. of primer	Polymorphic locus	No. of primer	Polymorphic locus
Using undigested template	73	0	24	68
Using 7 enzymes digested and undigested template	16	0	84	310

[z] Based on the results of analysis using 100 primers.

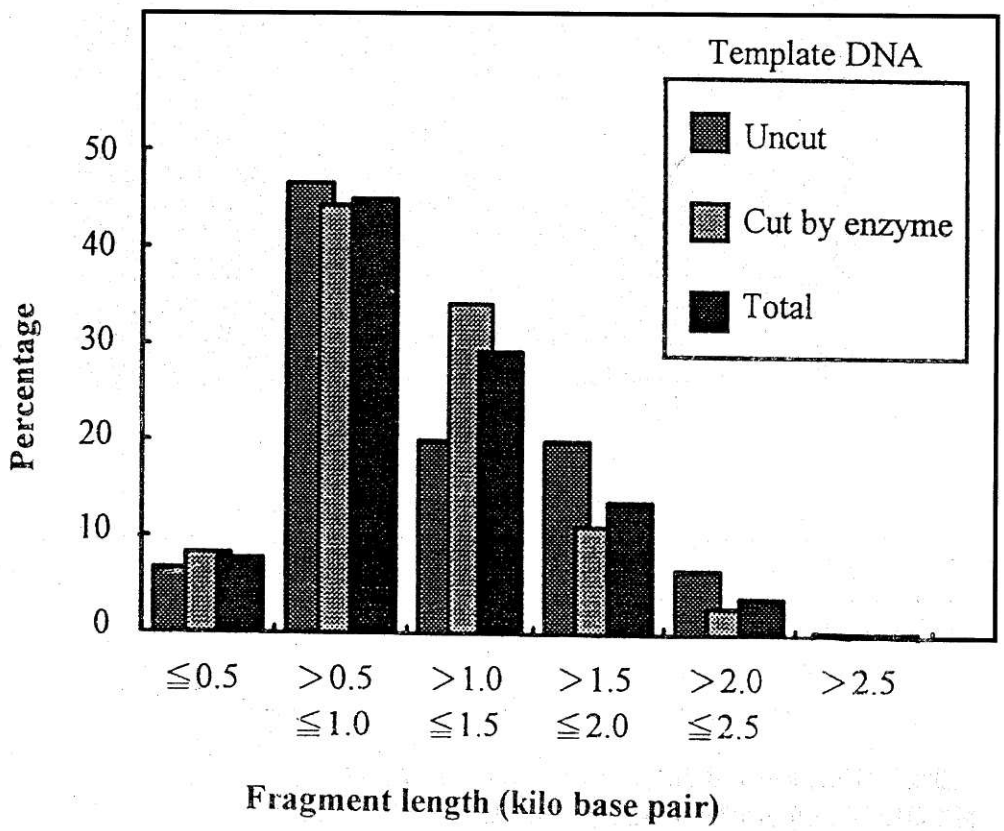

圖 3. 甜瓜 RAPD 條帶之核酸長度分佈情形

Fig. 3. The distribution of fragment length of RAPD bands in *C. melo.*

三、甜瓜 RAPD 標誌之遺傳

在所建立的多型性 RAPD 標誌中，唯有 F_1 植株中亦含有相關條帶者可在 F_2 族群中產生基因型分離現象，因而可供進一步的遺傳分析；本試驗中約 68 %之多型性標誌屬於此類，與依孟德爾原理所預測者(2/3)相近。爲進一步探討甜瓜 RAPD 標誌的遺傳特性，乃逢機選取 32 組多型性標誌進行 F_2 族群分析，再以卡方測驗檢驗其分離模式。F_2 族群分析結果顯示各組標誌皆有分離現象。由於各標誌皆爲親本中之一方及 F_1 具有條帶者(即：無條帶×有條帶→有條帶之 F_1，或有條帶×無條帶→有條帶之 F_1)，故應合乎 3：1(有條帶：無條帶)分離比。表 4 之卡方測驗結果顯示，以 5%爲顯著水準時，共有 23 組標誌與該擬說相符，佔 71.9 %；其餘 9 個有偏離現象，佔 28.1% (9/32)，其中高度偏離者(1% 顯著水準)僅佔 4 個(12.5 %)。換言之，將近 3/4 的甜瓜 RAPD 基因座之遺傳行爲可依孟德爾遺傳定律加以預測，僅少部份(略多於 1/4)有輕度偏離現象，而極度偏離者僅佔 1/8。

表 3. 甜瓜 RAPD-基因座在 F_2 族群中分離情形之適合度測試結果[z]

Table 3. Goodness of fit to the hypothesized segregation ratio of single RAPD-locus in *C. melo* [z]

Significance level	Numbers of segregating locus		
	Non-significant	Segregation distortion	Total
5%	23(71.9%)	9 (28.1%)	32
1%	28(87.5%)	4 (12.5%)	32

[z] Hypothesized segregation ratio： 3/1

表 4. 不同限制酶對 RAPD 條帶圖譜與多型性現象之影響[z]

Table 4. The influence of different restriction enzymes on the RAPD banding patterns and polymorphisms [z]

Enzyme	Cutting site	GC %	No. of locus changed
Alu I	(5'AG↓CT)	50	94 (23%)
Nde II	(5'↓GATC)	50	79 (19 %)
Rsa I	(5'GT↓AC)	50	71 (17 %)
Hae III	(5'GG↓CC)	100	61 (15 %)
Msp I	(5'C↓CGG)	100	43 (11 %)
Cfo I	(5'GCG↓C)	100	36 (9 %)
Taq I	(5'T↓CGA)	50	24 (6 %)
			Total 408

[z] Based on the results of analysis using 100 primers.

討 論

一、從限制酶對甜瓜 RAPD 圖譜之影響看 RAPD 標誌之獨立性

從本研究之結果可證明酵素之使用可改變甜瓜的RAPD圖譜形態，就同一酵素而言，此種改變既穩定且合乎遺傳基本原理。此外，本研究結果亦告訴我們不同酵素對條帶的影響方式不盡相同，因此若以不同酵素進行分析，則基因組內之特定地點可能顯示不同訊息。換言之，能否測得更多的遺傳變異顯然與是否使用酵素以及酵素種類有關。至於特定之RAPD基因座所表現之遺傳行爲是否會因酵素

而異？亦即RAPD標誌在遺傳行爲上有無獨立性？則爲另一亟須了解之問題。圖4之分析例子可就此問題之答案提供明確線索，由圖4可知，若同一RAPD標誌可被不同酵素處理所偵測到，且親本間的基因型一致，則全圖譜之面貌即使在不同酵素影響下有明顯差異，該基因座在F_2世代中之分離情形自有其獨立之模式。此暗示RAPD基因座爲已然存在者，酵素只會改變圖譜外貌並影響偵測效率，而與各標誌之基本獨立性及遺傳行爲無關。一般學者論及RAPD標誌時，往往對其可靠性有所評論[24,34]，對於上述之特性卻鮮有注意及者；本研究適可彌補這一缺失，從而提醒研究者注意分析方法之改進(包括應用酵素以提高偵測效率)，以致力於多型性之發現；只要分析時具有穩定之操作技術，則對RAPD標誌無須過度懷疑。

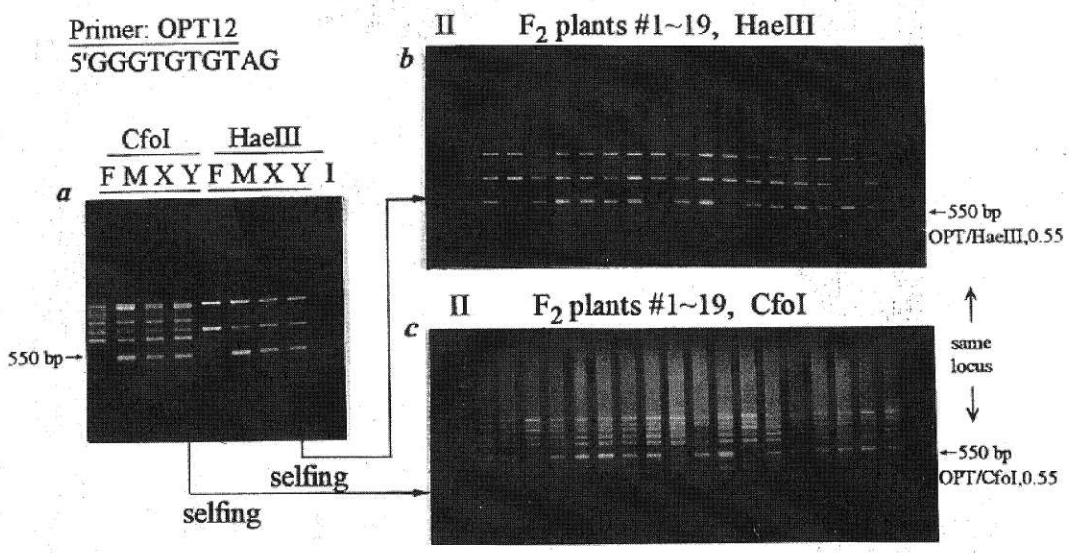

圖4. 由兩種不同限制酶處理但使用相同引子分析所產生的特定條帶在F2族群中表現一致的分離行爲，顯示其所代表的RAPD基因座具有明顯的獨立性

Fig 4. An example showing that different enzyme digestion may cause different banding styles in RAPD analysis, but not the segregation pattern in the F_2 population for a specific locus. Gel *a* was produced by female (F) and male (M) parents, and two F_1 hybrids (X, Y), their DNAs were digested with restriction enzyme *Cfo* I (left) or *Hae* III (right) before PCR. Gels *b* and *c* were produced by two parents (F, M), F_1 hybrid Y, and 19 F_2 progeny derived from Y, their DNAs were digested with *Hae* III (*b*) or *Cfo* I (*c*), respectively. The order of the plants in gels *b* and *c* are all the same. Although the two enzymes gave different total banding styles, the banding styles of the 550-bp bands are the same in Gel *a*. The segregation patterns of the 550-bp bands in both gels *b* and *c* are all the same too. This result implied that the 550-bp bands in both gels *b* and *c* represent the same RAPD-locus. Molecular weight markers I and II：100-bp DNA ladder and 1-kb DNA ladder, respectively.

二、限制酶在RAPD分析上之價值及其影響RAPD圖譜的可能原理與機制

Williams等學者[32]曾報告PCR反應前先用限制酶切割模板核酸可改變電泳的條帶式樣，但未進一步探討酵素對多型性及其遺傳特性的影響；本試驗在這方面則作了較深入而有系統的探討，證明配合限制酶可偵測到更多的核酸變異，從而提高分析效率，其詳情已如上述。Konieczny和Ausubel[15]以及Jarvis等人[14]曾報告將PCR產物以酵素切割亦可產生新的多型性，稱爲CAPS標誌；但此法須使分析

條帶單純化始有辦法判讀，因此需對增幅部位之核酸序列有較詳細了解，始能設計引子，以致難以廣泛應用。本研究所用方法則不需任何核酸序列資料，而且因每次所需之模板核酸極微量，一次酶解所製備的核酸即可供長期使用，甚爲省力，其餘之步驟皆與一般RAPD分析無異；此外，由於可供選擇之酵素種類甚多而且每次用量極微，若能愼選酵素，對於提高多型性偵測機率以及節省購買新引子之經費將甚有幫助。由此觀之，本法雖僅就原RAPD分析法稍作改進，然而就其所增加之優點而言，顯然有其實用價值。

由本研究結果可知限制酶對RAPD圖譜的影響可分爲條帶之消減與新增兩種方式，吾人推測此兩種改變之機制顯然皆與酵素切位有關。其中以條帶消減現象較易於了解，當酵素切位落於增幅區域，該處酶解後所形成的模板核酸將各僅剩一煉合端點，不利於增幅反應，該電泳條帶便會因而消失。以常理推之，越長之核酸段落帶有相關酵素切位之機率應越大，因此其條帶消失的機率亦越高，圖3的結果適可作爲此一推論之佐證。不使用酵素時，僅當煉合點發生變異始能引致條帶的差異，至於兩煉合點間的變異性則無法偵測出來，酵素的使用打破了此一限制，從而增加了分析的靈敏性。從另一角度觀之，此種藉由酶解而顯示的多型性現象，與RFLP的分析原理實有相似之處[5]，似可看作RFLP現象的另一種呈現方式。至於新增之條帶除了係受酵素切位影響而外，吾人推測此現象亦應與染色體上的重複序列(repetitive sequences)有關。當兩個對應的煉合位置相距較遠而無法形成增幅片段，若其中一部份爲重複序列且帶有酵素切位，則酶解後其重複序列之間可於PCR初期互相煉合，再經過延長反應形成新的模板，因而縮短兩個煉合點之距離，使增幅反應得以完成而產生新條帶。已知染色體上存有重複序列爲高等生物之普遍現象[6]，但產生新條帶之機制是否如上述所推測一般，則尚待求證。

三、從 RAPD 標誌探討甜瓜的遺傳特質

1. 甜瓜的遺傳歧異性

遺傳標誌所顯示的多型性現象係來自基因組內的變異，各種多型性的顯現機會固須以生物本身的遺傳變異程度爲基礎，然而在相當程度內亦受限於偵測方法。偵測方法的優劣取則決於其穩定性和靈敏度，由上述可知RAPD標誌具有可靠的穩定性，而限制酶之使用可顯著提高RAPD分析之靈敏度，增加多型性的偵測機率。然而甜瓜本身的遺傳歧異性程度更是各種遺傳研究的基礎，欲探討甜瓜的遺傳歧異性程度，可從不同物種之比較得知端倪。已知以未酶解之模板核酸進行RAPD分析時，平均僅5%之逢機引子可測得大豆自交品系間之多型性[18]，而在極具遺傳變異性的柑橘作物中，每一逢機引子可偵測到品種差異的機率則高達50%以上[7]。在相同方法下，本研究結果顯示每一逢機引子測得甜瓜品種差異之機率爲24% (表2)，此數值介於上述兩作物之間。甜瓜與大豆分屬常異交與自交作物，柑桔則具有極高度遺傳歧異性[7]，上述結果顯示甜瓜之遺傳歧異性介於大豆與柑桔之間，應屬合理。在同爲瓜類之作物中，若以甜瓜與西瓜及胡瓜相比較，則以甜瓜的RAPD多型性最豐富，胡瓜次之，西瓜最貧乏(未發表之數據)，顯示甜瓜的遺傳歧異性比其他兩種爲高，此現象顯然與甜瓜具有較多樣的演化過程有關[1]。

2. 甜瓜多型性的遺傳分離行爲

有關RAPD標誌在相關族群中的分離模式，不僅是遺傳分析的重要依據，也可用於了解一般遺傳行爲。表4顯示部分之甜瓜RAPD標誌在F_2族群中之分離情形有偏離孟德爾預測值之現象。這種偏離行爲顯然是生物界的普遍現象，在植物中曾有多位學者探討過，其種類至少包括番茄[12, 23]、萵苣[17]、甜椒[23]、甜菜[22]、馬鈴薯[10]、甘藍[16]、水稻[19]、玉米[12]、和柑桔[7, 9]等。已知會發生偏離者包括同功酶、RFLP、RAPD 等[7, 9, 17, 30]；此現象可發生於屬間、種間以及種內之雜交[7]，雖然原因仍未十分清楚，但部份學者認爲係自然界或人爲環境所施於之選種壓力(selection pressure)所造成[7]。前人研究亦發現偏離現象與物種特性及雜交組合方式有關，越是遠緣雜交之後代偏離機率越高，其在水稻之種內雜交僅爲12%[19]，在柑桔種間或屬間雜交中可達26.5%或40%[7, 9]，而番茄種間雜交更可高達68%[21]。

本研究之甜瓜材料屬於種內雜交族群，依上述不同作物之情形而言，其偏離程度應屬正常。經以LINKAGE-1 電腦軟體[27]進行連鎖分析，所建立之連鎖圖顯示甜瓜的偏離標誌似有聚集於某些部位之現象(未發表)，此暗示其偏離現象極可能和染色體的物理結構有關。

3. 甜瓜 RAPD 標誌與基因組核酸序列之關係

基於上述，限制酶既然可使遺傳變異的偵測範圍擴大到整個增幅區域，是否亦有助於瞭解增幅區的核酸序列特徵？亦爲一有趣之問題。由於各酵素之切位序列爲已知者，因此此問題可由各種切位之存在情形加以考察。由表 4 可推知不同酵素切位在所有增幅區域中之發生機率顯然不一，以 *Alu* I 最高，其餘依次爲 *Nde* II 、*Rsa* I 、*Hae* III 、*Msp* I 、*Cfo* I 和 *Taq* I 。各種酵素切位序列的 GC 所佔比率爲 50%或 100%（表 4），理論上越是富含 GC 序列之區域將越容易形成高 GC 比之酵素切位，反之亦然。表 4 之結果顯示在甜瓜之增幅區域內高 GC 比之酵素切位明顯少於其他者，此是否意謂著大部份 RAPD 標誌並非位於富含 GC 序列之區域？或者在甜瓜基因組中較少高 GC 序列之區域？則有待進一步探討。

結　論

RAPD 分析爲一簡便、經濟、安全之技術，極適合一般遺傳與育種研究室之使用。本研究結果則顯示配合限制酶的使用可提高甜瓜的RAPD分析效率，且可證明RAPD標誌之獨立性與穩定性，進而有助於瞭解其基本機制，使我們對 RAPD 標誌有進一步瞭解和掌握。

誌　謝

本研究承行政院農業委員會經費補助(計畫編號：80 農建-7.1-糧-121-17、81 農建-12.1-糧-67-14、82 科技-1.1-糧-56-15)，謹此致謝。

引用文獻

1. 王　堅。1982。甜瓜，589-600 頁。中國蔬菜栽培學(中國農業科學院蔬菜研究所主編)。農業出版社出版。
2. 林學正、蕭吉雄、張有明、林泰椿。1985。台灣省農業試驗所特刊第十八號-瓜類種源圖說。台灣省農業試驗所編印。
3. 蕭吉雄、楊偉正。1990。瓜類育種，203-221 頁。園藝作物育種講習會專刊。台灣省農業試驗所編印。
4. Baudracco-Arnas, S. 1995. A simple and inexpensive method for DNA extraction from *Cucumis melo* L. Cucurbit Genetics Cooperative Report. 18 : 50-51.
5. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32 : 314-331.
6. Bruford, M.W., O. Hanotte, J.Y. Brookfield, and T. Bruke. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. pp. 226-269. In : Hoelzel A.R. (ed.). Molecular genetic analysis of populations, a practical approach. Oxford Univ. Press, Oxford, England. 315 pp.
7. Cai, Q., C.L. Guy, and G.A. Moore. 1994. Extention of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. Theor. Appl. Genet. 89 : 606-614.
8. Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation : Version II. Pl. Mol. Biol. Rep. 1(4) : 19-21.
9. Durham, R.E., P.C. Liou, F.G. Gmitter Jr, and G.A. Moore. 1992. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in *Citrus*. Theor. Appl. Genet. 84 : 39-48.
10. Gebhardt, C., E. Ritter, T. Debener, V. Schachtschabel, B. Wakemeier, H. Uhrig, and F. Salamini. 1989. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. Theor. Appl. Genet. 78 : 65-75.
11. Gmitter, F.G.Jr, S.Y. Xiao, S. Huang, X.L. Hu, S.M. Garnsey, and Z. Deng. 1996. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. Theor. Appl. Genet. 92 : 688-695.
12. Helentjaris, T., M. Slomcum, S. Wright, A. Schaefer, and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet. 72 : 761-769.

13. Hu, J., and C.F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports 10 : 505-511.

14. Jarvis, P., C. Lister, V. Szabo, and C. Dean. 1994. Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 24 : 685-687.

15. Konieczny, A., and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant Journal 4(2) : 403-410.

16. Landry, B.S., N. Hubert, R. Crete, M.S. Chang, and T. Etoh. 1992. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes of race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). Genome 35 : 409-420.

17. Landry, B.S., R.V. Kesseli, B. Farrara, and R.W. Michelmore. 1987. A genetic map of lettuce *(Lactuca sativa L.)* with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphorlogical markers. Genetics 16 : 331-337.

18. Lin, J.J., J. Kuo, J. Ma, J.A. Saunders, H.S. Beard, M.H. MacDonald, W. Kenworthy, G.N. Ude, and B.F. Matthews. 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD, and AFLP DNA mapping techniques. Plant Molecular Reporter 14(2) : 156-169.

19. McCouch, S.R., G. Kochert, Z.H.Yu, Z.Y. Wang, G.S. Khush, W.R. Coffman, and S.D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76 : 815-829.

20. Neuhausen, S.L. 1992. Evaluation of restriction fragment length polymorphism in *Cucumis melo*. Theor. Appl. Genet. 83 : 379-384.

21. Paterson, A.H., E.S. Lander, J.D. Hewitt, S. Peterson, S.E. Lincoln, and S.D. Tanksley. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphism. Nature 335 (20) : 721-726.

22. Pillen, K., G. Steinrucken, G. Wricke, R.G. Herrmann, and C. Jung. 1992. A linkage map of sugar beet *(Beta vulgaris L.)* Theor. Appl. Genet. 84 : 129-135.

23. Prince, J., E. Pochard, and S.D. Tanksley. 1993. Contruction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. Genome 36 : 404-417.

24. Rasmussen, R., and G. Reed. 1992. Optimizing rapid cycle DNA amplification reactions. The Rapid Cyclist 1(1) : 1.

25. Skroch, P.W., and J. Niehuis. 1992. A RAPD protocol for the air thermo-cycler. The Rapid Cyclist 1(1) : 9-10.

26. Stanley, D. 1993. Mapping blueberry genes. Agri. Res. 1993 (9) : 20-21.

27. Suiter,K., J. Wendel, and J. Case. 1983. LINKAGE-1 : a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. J. Hered. 74 : 203-204.

28. Talemori, N., K. Shinoda, and N. Kadotani. 1994. RAPD markers for confirmation of somatic hybrids in the dihaploid breeding of potato*(Solanum tuberosum L.)*. Plant Cell Rep. 13 : 367-371.

29. Tingey, S.V., and J.P. del Tufo. 1993. Genetic analtsis with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Physiol. 101 : 349-352.

30. Torres, A.M., N.F. Weeden, and A. Martin. 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theor. Appl. Genet. 85 : 937-945.

31. Williams, J.G.K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18(22) : 6531-6535.

32. Williams, J. G. K., M.K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using RAPD markers. Methods in Enzymology 218 : 704-740.

33. Witter, C. T. 1992. Buffer and reaction components for rapid cycling. The Rapid Cyclist 1(1) : 6.

34. Wittwer, C. T., and D.J. Garling. 1991. Rapid cycle DNA amplification : time and temperaure optimization. BioTechniques 10 (1) : 76-83.

35. Wolff, D. W., and J. Zhou. 1996. Potential utility of RAPD markers linked to *Fom* 2 gene in melon (*Cucumis melo L.*). Cucurbit Genetics Cooperative Report 19 : 61-62.

A Study of Random Amplified Polymorphic DNA and Its Genetic Characteristics in *Cucumis melo* [1]

Pan-Chi Liou, You-Ming Chang, Wha-Shin Hsu,
Ying-Huey Cheng, Hwei-Ru Chang and Chi-Hsiung Hsiao [2]

Summary

In this paper we reported some genetic characteristics in *Cucumis melo* based on the analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers using a 3-generation population. It has been found in this study that the variation of RAPD banding patterns will occur if restriction enzyme was used for template DNA digestion before PCR. By the use of enzyme, the band number can be either reduced or increased. Our results showed that those phenomena can be stably repeated. This method can significantly enhance the efficiency of RAPD analysis. Some hypotheses were proposed to interpret the mechanism causing these phenomena and for the further understanding of RAPD markers. Our investigation has also confirmed the stability and independent behavior of RAPD-loci. Some genetic characteristics of *C. melo* have also been discussed based on the RAPD analysis.

Key words : *Cucumis melo* L., Polymerase chain reaction (PCR), Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Genetic analysis.

---

1. Contribution No. 1960 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Respecrively, Horticulturist, Assistant Horticulturist, Assistant, Assistant Horticulturist, Project Assistant, and Senior Horticulturist and Department Head, Department of Horticulture, TARI, wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.